

⑫ 公開特許公報(A) 平3-30697

⑬ Int.Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成3年(1991)2月8日

C 12 Q 1/26
C 01 F 17/00

A
D
Z

6807-4B
7158-4G
7158-4G
7158-4G
6807-4B

C 12 Q 1/28

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全8頁)

⑮ 発明の名称 試薬系におけるアスコルビン酸塩妨害の減少のための薬剤及びそれに関連する方法

⑯ 特 願 平2-164350

⑰ 出 願 平2(1990)6月25日

優先権主張 ⑱ 1989年6月26日 ⑲ 米国(US) ⑳ 371253

㉑ 発 明 者 ジェームス・ビー・ア アメリカ合衆国、インディアナ州、46530、グレンジャー
ルバレラ
㉒ 発 明 者 メイタク・テレサ・イ アメリカ合衆国、インディアナ州、46514、エルクハート、
ップ クリーク・ヘブン・ドライブ 51194
㉓ 出 願 人 マイルス・インコーポ アメリカ合衆国、インディアナ州、46514、エルクハート、
レーテッド ミルトル・ストリート 1127
㉔ 代 理 人 弁理士 津 国 肇 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

試薬系におけるアスコルビン酸塩妨害の減少のための薬剤及びそれに関連する方法

2. 特許請求の範囲

(1) 試薬系におけるアスコルビン酸塩妨害を実質的に除去するための方法であって、試薬系に水不溶性セリウムIV化合物を添加することを特徴とする方法。

(2) セリウムIV化合物が次の：

(a) トリス(トリニトラトセリウム)パラベ
ルイオデート、

(b) ビス(トリニトラセリウム)クロメート、

(c) フッ化セリウム、

(d) 水酸化セリウム、

(e) 酸化セリウム、及び

(f) ヨウ素酸セリウム

から成る群の一員である請求項1記載の方法。

(3) 試薬系におけるアスコルビン酸塩妨害を実質的に除去するための薬剤であって、水不溶性セ

リウムIV化合物を含むことを特徴とする薬剤。

(4) セリウムIV化合物が次の：

(a) トリス(トリニトラトセリウム)パラベ
ルイオデート、

(b) ビス(トリニトラセリウム)クロメート、

(c) フッ化セリウム、

(d) 水酸化セリウム、

(e) 酸化セリウム、及び

(f) ヨウ素酸セリウム

から成る群の一員である請求項3記載の薬剤。

3. 発明の詳細な説明

発明の背景

I. 産業上の利用分野

本発明は、試薬系、特にオキシダーゼ/ペルオキシダーゼ結合反応、又は同様の種類のレドックス化学を用いる試験系におけるアスコルビン酸塩妨害を除去するための薬剤及び方法に関する。本発明は、基質がアスコルビン酸塩のような還元体に感受性である酵素/基質反応を伴う試薬系に用いることもできる。したがって、本発明は、グル

コース、潜血、コレステロール、トリグリセリド及び尿酸、並びにその他の分析物の測定のための分析物試験系におけるアスコルビン酸塩の妨害を除去するために用い得る。さらに、本発明の薬剤及び方法は、水不溶性セリウム(IV)化合物の使用を包含する。

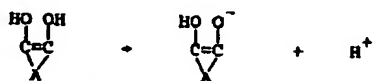
II. 従来技術の考察

アスコルビン酸は、果物及び野菜のような多数の食物中に天然に存在する重要かつ十分公知の栄養素であって、食物添加物又はビタミン補給体として安価に合成することもできる。その結果、アスコルビン酸は相対的に豊富であって、一般の人々は必要以上のアスコルビン酸を摂取しがちである。

過剰量のアスコルビン酸は一般的に無害である。というのは、身体はその短期間の需要に見合うに十分な量のアスコルビン酸のみを吸収し、その過剰量を身体の前尿系によって迅速に一掃するからである。その結果、アスコルビン酸は、医学分析に用いる尿試料中にしばしば見出される。

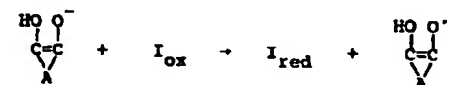
色応答)、 I_{ox} は酸化状態の指示薬である(陽性色応答)。

しかしながら、溶液中のアスコルビン酸は次のように反応する:



アスコルビン酸 アスコルビン酸塩 水素イオン

(式中、AはC、H、Oと定義される)。アスコルビン酸塩は、電子を供与し、それによって電子を受容する物質を還元し得るために、還元体である:



アスコルビン酸塩

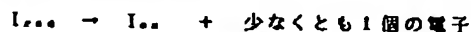
アスコルビン酸塩
ラジカル

このようにして、アスコルビン酸塩は、それが酸化形態である場合は指示薬を還元することによりレドックス指示薬を妨害し得るし、それによって意図した変色を阻害し、『偽陰性』(誤って陰

性ながら、尿中のアスコルビン酸は、現存の多数の尿試験に対する望ましくない妨害となり得る。尿試験は、概して、一般の人々を診断及び治療する際の重要な医学的手段であり、したがって、近年、この問題に多くの注意が集まっている。

尿試験はしばしばレドックス指示薬を包含し、これらの指示薬は、一般に、その還元形態で試験系に混入される。指示薬は、酸化剤の存在によりそれらが還元状態から酸化状態に移る時に色を変えるために、酸化されると変色し、したがって『レドックス』指示薬と呼ばれる。

多数の試験系において、問題の分析物は直接又は間接的に試験系のレドックス指示薬の酸化を引き起こし、それによって分析物の存在と関連する検出可能な応答を引き起こす。言い替えば、試験系に適当な分析物を加えた場合、レドックス指示薬は以下の反応を行う:

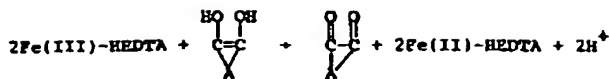


(式中、 I_{red} は還元状態の指示薬であり(陰性の

性となること)を引き起こす。

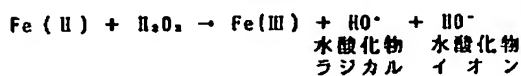
多くの方法が試みられてきたが、その中には上首尾に、アスコルビン酸がある試験系のレドックス指示薬に及ぼし得る悪作用を除去する方法もある。首尾よく行われた一方法は、Mayambala-Nwanika等により米国特許第4,587,220号に開示されているが、この場合、第二鉄錯体はヒドロペルオキシドと化合して、アスコルビン酸塩掃去剤として作用する。この掃去剤系は、レドックス指示薬のアスコルビン酸塩による還元を防止する。

Mayambalaの場合、 Fe^{++} はHEDTA(N-2-ヒドロキシエチルエチレンジアミン三酢酸)のような鉄キレート化合物と錯体を形成し、アスコルビン酸と反応する。鉄(III)キレート化合物は、以下のようにアスコルビン酸を掃去する:



鉄(Ⅲ) 鉄(Ⅱ)
錯体 錯体

Wayambala の掃去剤は、アスコルビン酸中の第二アルコール基をケトンに酸化し、このようにしてアスコルビン酸を、レドックス指示薬系を妨害しない非還元性化合物に転換する。しかしながら、Fe(Ⅱ)-HEDTA は、以下のように、ペルオキシド又はヒドロペルオキシドを用いて Fe(Ⅲ)-HEDTA にリサイクルされる：



その結果生じる水酸化物ラジカルは、以下の反応：



によって電子を受け取ることができ、したがって酸化剤として作用し得る。その結果、指示薬がその還元(本来の)形態である場合、水酸化物ラジ

カルはレドックス指示薬を酸化することができ、それによって、問題の分析対象物が存在するか否かにかかわらず、変色を引き起こす。その結果として、アスコルビン酸による偽陰性を防止する際に、Wayambala のアスコルビン酸掃去剤は望ましくない偽陰性を生じ得る。アスコルビン酸掃去剤系は1つの問題を解決せんとして他の問題を生じる。

Wayambala の特許は、掃去剤系の酸化作用を最小限にするために慣用緩衝液による試験系の pH の調節を示唆している。事実、酸化反応は通常酸触媒性であり、異なる酸化反応は異なる動的相互作用を伴い得るため、アスコルビン酸掃去剤系による指示薬の酸化を実質的に促進することなく分析対象物による指示薬の酸化を促す pH を見出し得る。

Wayambala の特許は、試薬系を2つの浸漬溶液に分ける乾性層フォーマットをも示唆している。一方の浸漬液を支持体上に包含せしめて乾燥し、その後第二の浸漬液も支持体上に包含せしめて、

乾燥する。したがって、Wayambala は、所望の酸化反応が望ましくない酸化反応の優位を占める方法で、試薬系のある種の成分が乾性フォーマットにおいておそらく分離され得る、ということを示唆している。

しかしながら、pH調節が全ての試薬系に対して有益であると立証され得るわけではなく、乾性相系を生じるための多重浸漬工程が全ての試薬系に対して常に実際的又は実行可能であるとは限らない。さらに、液体フォーマットは、いくつかの場合においては、乾性相フォーマットより望ましいことがある。

その結果として、レドックス指示薬系の信頼性に悪影響を及ぼさずにアスコルビン酸塩又は同様の種類の還元体による妨害を除去し得る系を提供することが、本発明の目的である。

さらに本発明の目的は、溶液形態で用い得る、又はある浸漬法を用いて試薬ストリップ中に包含せしめ得るアスコルビン酸塩耐性試験系を提供することである。

本発明のその他の目的及び特徴は、以下の明細書、特に好ましい実施例の詳細な説明及び特許請求の範囲を読めば、当業者には明らかになる。

Ⅲ. 情報開示

Kaminagayashi 等 "A Container for Sample Analysis Based on Enzymic and Diazo Coupling Reactions". 日本国特許出願第 84/53478 号、3月22日(1984)は、アスコルビン酸妨害を実質的に伴わずに尿中グルコースを測定するための用具としての、メチルセルロース(2.5%)及び NaIO₄ (10mg/ml)を含む溶液で処理した耐水性紙コップの使用を記載している。

Tom ["Immunoassay": 欧州特許出願第 103,958 号、3月28日(1984)] は、検出可能産物の生成を触媒するためにペルオキシダーゼを用いる試薬ストリップ免疫試験法を開示している。試薬固定後に過ヨウ素酸塩に吸水性支持体を含浸して、試料中のアスコルビン酸塩による妨害を低減又は除去する。

"Method and Diagnostic Agents for the Detection of Redox Reactions" (欧州特許出願第0037056号、1981年3月24日)には、アスコルビン酸を酸化するためのヨウ素酸塩の使用が記載されている。過ヨウ素酸塩は、アスコルビン酸に加えてほとんどの指示薬を酸化するために、使用し得ないことが特に教示されている。

Tomioka 等 ["Cerium Catalyzed Selective Oxidation of Secondary Alcohols in the Presence of Primary Ones", *Tetrahedron Letters*, 23(5):539-542(1982)] は、選択的酸化のために有効な試薬として $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6 \cdot \text{NaBrO}_3$ 、又は $\text{Ce}(\text{SO}_4)_3 \cdot 2\text{H}_2\text{SO}_4 \cdot \text{NaBrO}_3$ の組み合わせを記載している。

Firouzabadi 等 ["Dinitratocericum (IV) Chromate Dihydrate, $[\text{Ce}(\text{NO}_3)_2]\text{CrO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, a Mild Reagent for the Oxidation of Organic Compounds in Organic Media",

(1984)] は、好収量を伴う、ドライベンゼンにおけるベンジルアルコール及びジオールのような種々の有機化合物の酸化のための表題化合物の調製及び使用を論じている。

Firouzabadi 等 ["Ceric Triethylammonium Nitrate $[\text{Ce}(\text{Et}_3\text{NH})_2](\text{NO}_3)_6$, an Efficient Oxidant for the Oxidation of Benzylic Alcohols and α -hydroxy Ketones to Their Corresponding Carbonyl Compounds Under Mild Conditions", *Synthetic Communications*, 13(13):1143-1147(1983)] は、ベンジルアルコールの酸化、及び α -ヒドロキシケトンの、好収量を伴う塩化メチレンにおけるそれに対応する化合物への酸化のための表題化合物の調製及び使用を論じている。

Ho ["Cerium(IV) Oxidation With a Dual Oxidant System: Reaction of Some Arylaethanols", *Synthesis*, 12, pp. 936(1978)] は、 $\text{Ce}(\text{IV})$ /臭素酸塩の二重酸化体系を記載している。

Synthetic Communications, 14(10):937-981(1984)] は、ベンジルアルコール及びジオールのような種々の有機基質のベンゼン中における酸化のための表題化合物の調製及び使用を考察している。

Firouzabadi 等 ["ビス [トリニトラトセリウム (IV)] クロメート, $[\text{Ce}(\text{NO}_3)_2]\text{CrO}_4$: A Mild Oxidant in Organic Synthesis", *Synthetic Communications*, 14(7):631-637(1984)] は、ベンジルアルコールのアルデヒド及びケトンへの酸化、 α -ヒドロキシケトンのジケトンへの酸化、ヒドロキノンの *p*-ベンゾキノンへの酸化、及びカテコールの *o*-ベンゾキノンへの酸化に際しての表題化合物の調製及び使用を論じている。

Firouzabadi 等 ["トリスートリニトラセリウム (IV) パラベルイオデート $[(\text{NO}_3)_2\text{Ce}] \cdot \text{H}_2\text{IO}_6$, An Efficient and a Versatile Oxidant in Organic Synthesis", *Synthetic Communications*, 14(11):1033-1042

上記の引用例は、全般に、本発明の化学に関係する。しかしながら、これらの参考文献の中で、本発明のセリウム (IV) 化合物がアスコルビン酸塩を選択的に酸化するために使用可能であり、それによって試験系に通常使用される所望のレドックス結合反応を妨害することなく、アスコルビン酸妨害を除去し得る、ということを教示又は示唆しているものはない。

発明の要約

本発明は、試薬系、特にオキシダーゼ/ペルオキシダーゼ結合反応、又は同様の種類のレドックス化学を用いる試験系におけるアスコルビン酸塩妨害を除去するための薬剤及び方法に関する。本発明は、基質がアスコルビン酸塩のような還元体に感受性である酵素/基質反応を伴う試験系に用いることもできる。本発明の薬剤は、水不溶性セリウム (IV) 化合物を包含する。

好ましい実施例の詳細な説明

レドックス反応を用いた多くの試験系が、アスコルビン酸の存在による悪影響を受ける。本発明

は、水不溶性セリウムIV化合物の使用に関する。
 硝酸セリウム、硫酸セリウム、硝酸アンモニウムセリウム(CAN)、硝酸トリエチルアンモニウムセリウム(CTEN)等のような可溶性セリウム化合物に比して、水酸化セリウム、酸化セリウム、フッ化セリウム、ヨウ素酸セリウム、トリス(トリニトラトセリウム)パラベリオデート(TNCP)、ビス(トリニトラトセリウム)クロメート(BTCC)、セリウムアセチルアセトナート、セリウムトリフルオロアセチルアセトナート、及びビリジニウムヘキサクロロセレートのような不溶性セリウム化合物は、アスコルビン酸妨害の克服に有用である。本発明の化合物は、任意の水不溶性セリウムIV化合物であり得る。スラリー形態でのこのような水不溶性セリウムIV化合物の濃度は、一般的に、約5〜約50mM(ミリモル)、特に約7〜約37mMの範囲である。濃度が5mMより低い場合は一般的に有効でなく、一方、約50mMを上回る濃度の場合には有効ではあるがしかし利益増大をもたらさない傾向がある。

成

セリウム(IV)酸化体を、以下の操作により調製した：

(1) トリス(トリニトラトセリウム)パラベリオデート(TNCP)



過ヨウ素酸カリウム(4.6gm, 20mmol)を200mlの加温脱イオン水に溶解した。その溶液をわずかに放冷した後、30mlの脱イオン水に溶解した硝酸アンモニウムセリウム(32.9gm, 60mmol)の溶液を5分間に亘って滴下添加した。次いで、その結果生じた反応混合液を室温で3時間攪拌した。レモン色の固体が分離したが、これを濾過し、脱イオン水で2回洗浄し、100mlの脱イオン水中に懸濁し、凍結乾燥して、10.8gm(グラム)の黄色固体を得た(収率48%)。このようにして調製した物質は、水溶液中により容易に再懸濁し得る。

(2) ビス(トリニトラトセリウム)クロメー

る。

本発明の化合物はアスコルビン酸塩を選択的に酸化し、それによってアスコルビン酸妨害を除去する。本発明のセリウムIV酸化体は特異的であって、慣用レドックス指示薬系存在下では、通常、いかなる発色をも生じない。

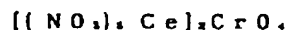
例えば、実施例に示される化合物TNCPは、10秒間の混合時間以内に、試験試料中に存在する250ミリグラム/デシリットル(mg/dl)までのアスコルビン酸のアスコルビン酸妨害を除去し得る。アスコルビン酸塩妨害の迅速且つ有効な除去により、オキシダーゼ/ペルオキシダーゼ結合反応及びレドックス指示薬系を用いる大半の試験の精度が改良される。

本発明のセリウムIV酸化体は、pH依存性でない。それらを容易に調製し、濾過具上で容易に含浸又は固定して不均質試験系を生成し得る。

実施例

1. 水不溶性セリウムIV化合物(1)及び(2)、並びに水溶性セリウム化合物(3)の合

上(BTCC)



重クロム酸カリウム(11.8gm, 40mmol)を200mlの脱イオン水に溶解し、つぎに、60mlの脱イオン水に溶解した硝酸アンモニウムセリウム(21.9gm, 40mmol)の溶液を10分間に亘って滴下添加した。直ちに、オレンジ色の固体が分離した。室温で2時間攪拌後、その反応混合液を濾過し、脱イオン水で3回洗浄した。つぎにその固体を50mlの脱イオン水に再懸濁し、凍結乾燥して、14.3gmのオレンジ色の固体を得た(収率92%)。

(3) 硝酸トリエチルアンモニウムセリウム(CTEN)



水酸化セリウム(10.4gm, 50mmol)を加熱しながら35mlの硝酸に溶解した。その溶液をわずかに放冷し、トリエチルアミン(20.9ml, 150mmol)を約5分間に亘

て滴下添加した。その結果生じた反応混合液を室温で3時間攪拌し、次いで氷浴中で冷却した。その結果生じたオレンジ色の沈澱物を濾過し、脱イオン水で素速く洗浄し、熱水から再結晶化して、4gのオレンジ色の固体を得た（融点135℃、収率11%）。

II. アスコルビン酸塩妨害を防止するための水不溶性セリウムIV化合物の使用

2つの浸漬溶液中にWhatman 54紙を含浸することにより、低範囲グルコースパッドを作製した。第一の浸漬液は1-メトキシ-2-プロパノールに溶解した100mM(ミリモル)テトラメチルベンジジン(TMB)及び0.5%エアゾールOT(Aerosol OT)から成っており、第二の浸漬液は、0.2Mスルホン酸モルフォリノエタン(緩衝液としてナトリウム塩(pH6.0))に溶解した250単位/μlのSigma VII型グルコースオキシダーゼ、500単位/μlのペルオキシダーゼ、2%ポリビニルピロリドン(PVP)K-60、及び0.01%FD&Cイエロー#5から

成っている。

表 I は、セリウム酸化体がアスコルビン酸還元剤としていかに働いたかについての結果を示す。酸化体を用いない場合に比して、酸化体が存在する場合はバッド反応性の顕著な改良が観察された。

比較として、表IIはある種の水溶性セリウム酸化体の結果を示す。いかなるグルコース又はアスコルビン酸も存在しない場合には、これらの可溶性セリウム酸化体は偽陽性の結果をもたらすと考えられる。

[illegible]

相対的還元性は、 $1.00\text{mg}/\text{ml}$ のグルコースを含有し、アスコルビン酸を含まない培地の反射率 (K/S) に基づいたパーセンテージとして算出する。

反応率測定値は、十分に公知の Kubelka-Munk の等式 [Gustav Kortum, "Reflectance Spectroscopy", pp.106-111, Springer Verlag, NY(1969) 参照] の簡易形態を用いて評価した：
 $K/S = (1-R)^2 / 2R$ (式中、R は試験具からの反射率であり、K は定数であり、S は特定の反射媒質の光の散乱係数である)。

化合物	酸化体	濃度	単位	グルコース	アスコルビン酸	濃度	単位	相対的反応性*
CAN	10 (水溶液)			0	0	0	0	4
				100	50	100	50	100
				100	100	100	100	91
				100	200	200	200	69
				100	250	250	250	0
CTEN	19 (水溶液)			0	0	0	0	9
				100	50	100	50	100
				100	100	100	100	102
				100	200	200	200	100
				100	250	250	250	32
	19 (水溶液)			0	0	0	0	6
				100	50	100	50	100
				100	100	100	100	88
				100	200	200	200	74
				100	250	250	250	14

* 相対的反応性は、100mg/dl のグルコースを含む、アスコルビン酸を含まない溶液の反射率 (K/S) に基づいたパーセンテージとして算出する。

フィルターランジャー及びポリプロピレン試験管から成る試験用具を開発した。慣用試験薬系をセリウムIV酸化体とともに試験管に入れる。フィルターランジャーを試験管内に押し込んで溶液から固体セリウム酸化体を分離し、それによって、不溶性セリウムIV酸化体による妨害を伴わずに試薬系の分析ができる。

実験は、以下の通りに実施した：水に溶解した 0.2 M トリス (トリニトラトセリウム) パラベリオデート懸濁液 100 μ l (マイクロリットル) を含入するポリプロピレン試験管に、100 mg/dl のグリコース及び 100 mg/dl のアスコルビン酸を含む 0.1 M 燐酸塩 (pH 7) 1 ml を加えた。その懸濁液を 5 秒間混合し、つぎにフィルターランジャーを押し込んだ。50 μ l のアリコート をピペットで移し、0.1 M 燐酸塩 (pH 7) 溶液で 500 μ l に希釈した。次いで、7 μ l をピペットで低範囲グルコースパッド上に移し、Seralyzer ④ 反射光度計を用いて 600 nm (ナノメータ) の波長で反射率を測定した。60 秒反応

での K/S を記録した。図は、0、30、50、65、80、90 及び 120 mg/dl のグルコースを含む溶液を用いた場合の標準曲線の結果を示す。

Ⅲ. 液体フォーマットにおける TNC P (トリニトラトセリウム) パラベリオデート) の性能

酸化体 TNC P を、アスコルビン酸掃去剤としてのその反応性に関して液体試験でスクリーニングした。用いた全操作を以下に示す：

1) 12 \times 75 mm 試験管中で、酸化体を緩衝液と混合した。

2) グルコース及びアスコルビン酸溶液を加え、その結果生じた物質を約 10 秒間混合した。

3) 緩衝液 MES (4-モルホリンエタンスルホン酸) (pH 6) に溶解したそれぞれ 100 mM、300 単位/ml、及び 500 単位/ml の溶液に含浸したテトラメチルベンジジン (TMB)、グルコースオキシダーゼ、及び

ペルオキシダーゼを含むグルコースパッド (Whatman 54紙) をその混合液中に含浸し、発色率を記録した。

4) 対照実験を行なったが、この場合、酸化体又はグルコースあるいはアスコルビン酸は存在しなかった。

緩衝液: リン酸、0.4M, pH7
グルコース: 100mg/dl
アスコルビン酸: 100mg/dl
酸化体: TNCP

TNCP [*] の濃度	偽陽性 [*]	反応性 [*]
7mM	—	非常によく反応する
19mM	—	非常によく反応する
36mM	—	非常によく反応する

- * スラリー形態で、
- * グルコース及びアスコルビン酸がともに存在しない場合には、偽陽性試験を実施した。
- * 混合後10秒以内に反応性を測定した。

したがって、前述から、本発明は本発明の全目的を達成するのに、並びにアスコルビン酸により妨害されるレドックス反応を用いた試験系によるその他の多数の利益を得るのに十分適合している

の特許請求の範囲で示されるような制限が課せられるだけである。

4. 図面の簡単な説明

図は、異った一定のグルコース濃度を有する溶液の、グルコース濃度とK/S値の間の関係を示す標準曲線である。

ことが判かる。酸化体系は非常に迅速で且つ有効である。例えば、TNCPは、10秒間の混合時間内に試験試料中に存在する250mg/dlまでのアスコルビン酸の妨害を除去し得る。つぎに、酸化体系は特異的である。TNCP及びBTCCのような水不溶性酸化体は、グルコースが存在しない場合は、指示薬テトラメチルベンジジンと反応して発色することはない。CAN及びCTENのようなより水溶性のセリウム酸化体は、グルコースの非存在下では10%未満の発色を示す。

本発明のさらなる利点は、アスコルビン酸塩妨害を有効に除去すると、試験溶液中のグルコース測定のための精度が改良されるという事実である。さらに、本発明の酸化体系はpH依存性でない。さらにまた、酸化体を容易に調整し、不均質試験系のための汎通器具上に容易に含浸し、又は固定化し得る。

明らかに、前述と同様の本発明のその他の多数の改良及び変法は、本発明の精神及び範囲を逸脱することなく実施し得るので、したがって、添付

